



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**

(10) **DE 195 39 493 A 1**

(51) Int. Cl. 6:

C 12 N 15/79

C 12 N 15/85

C 12 N 15/62

C 12 N 15/58

C 12 N 15/20

C 12 N 15/28

C 12 N 15/18

C 12 N 15/27

C 12 N 15/53

C 12 N 5/10

C 07 K 19/00

(21) Aktenzeichen: 195 39 493.3

(22) Anmeldetag: 24. 10. 95

(43) Offenlegungstag: 30. 4. 97

(71) Anmelder:

Dr. Karl Thomae GmbH, 88400 Biberach, DE

(72) Erfinder:

Ennenkel, Barbara, Dr., 88447 Warthausen, DE;
Gannon, Frank, Prof., 69115 Heidelberg, DE;
Bergemann, Klaus, Dr., 88400 Biberach, DE; Noé,
Wolfgang, Dr., 88400 Biberach, DE

(54) Starker homologer Promotor aus Hamster

(57) Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster. Insbesondere handelt es sich dabei um den Promotor des Gens, das für das Ubiquitin-S27a-Fusionsprotein kodiert. Der Promotor kann für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen verwendet werden, insbesondere in CHO-Zellen.

DE 195 39 493 A 1

DE 195 39 493 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster, Nukleinsäuren, die Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte unter Verwendung solcher Nukleinsäuren.

Bei der wirtschaftlich bedeutenden Herstellung von Proteinen durch Expression rekombinanter Gene in eukaryontischen Wirtszellen, beispielsweise CHO-Zellen, werden bisher heterologe Expressionssysteme verwendet, d. h. daß zum Beispiel die Promotor/Enhancer- sowie Terminationselemente viralen Ursprungs sind. Die Verwendung von nichtviralen Promotoren an Stelle von viralen Sequenzen in Expressionssystemen wäre im Hinblick auf die Einstellung der Öffentlichkeit bezüglich Gen- und Biotechnologie von Vorteil und würde außerdem zur Biosicherheit der Vektorsysteme, die für die Expression von Genen in tierischen Zellkulturen verwendet werden, beitragen.

Beim Ubiquitin handelt es sich um ein hoch konserviertes Polypeptid von 76 Aminosäuren, das in allen eukaryontischen Zellen in großer Zahl zu finden ist und durch eine diverse Genfamilie kodiert wird (Reviews: Jentsch et al, 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Ubiquitin spielt durch die Modifizierung von Targetproteinen eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z. B. der ATP-abhängigen Proteindegradation über den Ubiquitin-Proteosomen-Weg (Ciechanover, 1994). Auf Grund ihrer Struktur kann man die Ubiquitingene in zwei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe sind die Polyubiquitingene zusammengefaßt, in denen 228 bp große Ubiquitin-Kodiereinheiten (= 76 Aminosäuren) in Kopf-zu-Schwanzanordnung aneinander gereiht sind (Jentsch et al, 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die Anzahl der Einheiten variiert von Spezies zu Spezies, wobei man in den meisten Organismen zwei Polyubiquitingene unterschiedlicher Länge findet (Fornace et al, 1989; Wiborg et al, 1985). Die Promotorregionen dieser Gene enthalten eine TATA-Box und Promotor/Enhancer-Elemente für einen Hitzeschockinduktör (Schlesinger & Bond, 1987).

Die Ubiquitinfusionsgene werden der zweiten Gruppe zugeordnet. Es handelt sich dabei um Fusionen zwischen einer Ubiquitineinheit und einem ribosomalen Protein (Jentsch et al, 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die beiden bekannten Ubiquitinfusionsgene können auf Grund der Unterschiede in der Länge und Sequenz des ribosomalen Proteins identifiziert werden. In dem einen Fall handelt es sich um ein ribosomales Protein der großen Ribosomenuntereinheit mit einer Länge von 52 Aminosäuren (Baker et al, 1991) und in dem anderen Fall um ein ribosomales Protein der kleinen Ribosomenuntereinheit (in Säugern als Protein S27a bezeichnet) mit einer speziesabhängigen Länge von 76 bis 81 Aminosäuren (Redman & Rechsteiner, 1989). Der Ubiquitinanteil in diesen Fusionsproteinen unterstützt dabei anscheinend die effiziente Integration der ribosomalen Proteine in das Ribosom (Finley et al, 1989).

Die individuellen Ubiquitingene werden in den verschiedensten Geweben eines Organismus und in verschiedenen Entwicklungsstadien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. So werden die Polyubiquitingene konstitutiv in geringem Level, der lediglich unter Streßeinwirkung stark erhöht wird, exprimiert (Fornace et al, 1989; Schlesinger & Bond, 1987). Die Ubiquitinfusionsgene werden vor allem verstärkt in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. In terminal differenzierten und wachstumsarretierten Zellen ist die Expression hingegen herunterreguliert (Schlesinger & Bond, 1987; Shimbara et al, 1993; Wong et al, 1993).

Die Aufgabe, deren Lösung der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, war die Bereitstellung starker nichtviraler Promotoren für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen, insbesondere Hamsterzellen.

Überraschend wurde ein Promotor eines Gens aufgefunden, der insbesondere in CHO-Zellen eine dem viralen SV40-Promotor gleichwertige Aktivität hat. Dieses Gen kodiert für das Ubiquitinfusionsprotein Ub/S27a. Der Ub/S27a-Promotor ist Gegenstand der Erfindung, insbesondere der Ub/S27a-Promotor aus Hamster. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Regulatorsequenzen in der 5' untranslatierten Region des Ub/S27a-Gens.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ub/S27a-Gens enthält. Bevorzugt sind dabei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ub/S27a-Gen des Hamsters abgeleitet. Insbesondere ist ein Nukleinsäuremolekül Gegenstand der Erfindung, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen enthält, die in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die Sequenzen aus dem Bereich enthalten, der den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht. Es liegt im Können des Fachmanns, mit den Methoden, die in Beispiel 4 beschrieben werden, Nukleinsäuremoleküle herzustellen, die Teilsequenzen der erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, insbesondere eine Teilsequenz des Bereichs von -161 bis -45, die ebenfalls starke Promotoraktivität vermitteln können. Solche Teilsequenzen sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Es liegt auch im Können des Fachmanns, die Promotorsequenz durch Substitution, Insertion, Deletion oder Addition von einer, zwei, drei oder mehr Basen gegenüber der Sequenz gemäß Abb. 5 zu verändern, ohne dadurch die Promotoraktivität, die mit der in Beispiel 4 beschriebenen Methode gemessen werden kann, deutlich zu erniedrigen. Unter einer deutlichen Erniedrigung der Promotoraktivität soll eine Erniedrigung um mehr als 50% des Wertes, der für das 272-bp-Deletionsfragment aus Tabelle 1 im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 unter vergleichbaren Bedingungen erhalten wird, verstanden werden. Solche Varianten der Promotorsequenz sind daher ausdrücklich in die Erfindung eingeschlossen.

In den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen sind die Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen vorteilhaft mit einem Gen funktionell verknüpft, so daß dieses Gen unter der Kontrolle dieser Sequenzen exprimiert werden kann. Ein solches Gen kann beispielsweise für Gewebeplasminogenaktivator (EP 0093619), ein second-generation-Plasminogenaktivator, z. B. tnk-t-PA (WO 93/24635), Interferon, z. B. Interferon- α

(EP 0595241), Interferon- β (EP 0041313, EP 0287075), Interferon- γ (EP 0146354) oder Interferon- ω (EP 0170204), Tumornekrosefaktor (EP 0168214), Erythropoetin (WO 86/03520), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (EP 0220520, EP 0237545) oder Mangan-Superoxiddismutase (EP 0282899) kodieren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Zweckmäßig kann ein solches Nukleinsäuremolekül ein Expressionsvektor sein (Sambrook et al., 16.3 – 16.29, 1989). Gegenstand der Erfindung sind besonders auch solche Expressionsvektoren, die nach der Einführung in eine eukaryontische Wirtszelle durch Rekombination in deren Genom integriert werden.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, in die eines der genannten Nukleinsäuremoleküle eingeführt wurde. Bevorzugt ist in eine solche Wirtszelle ein Expressionsvektor eingeführt, der das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Ub/S27a-Gens und/oder weiteren regulatorischen Sequenzen enthält. Die erfindungsgemäße Wirtszelle ist bevorzugt eine Säugerzelle. Insbesondere kann die Wirtszelle eine Hamsterzelle, z. B. eine CHO- (CHO = Chinese hamster ovary; Urlaub et Chasin, 1980; vgl. auch Kaufman, 1987 sowie Referenzen darin, sowie Sambrook et al., 16.28 – 16.29, 1989), BHK- (BHK = Baby hamster kidney) oder Hybridomzelle, besonders bevorzugt eine CHO-Zelle sein.

10

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß eines der erwähnten Nukleinsäuremoleküle in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das synthetisierte Genprodukt isoliert wird. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ub/S27a-Gens, vorzugsweise aus Hamster, exprimiert. Vorteilhaft können für ein solches Verfahren Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die Promotorsequenzen und/oder regulatorische Sequenzen enthalten, die in der Abb. 5 enthalten sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen –161 bis –45 gemäß Abb. 5 entspricht. Auch hier liegt es im Können des Fachmanns, Teilsequenzen mit Promotoraktivität oder gleichwertige Varianten der offenbarten Sequenzen herzustellen.

15

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein starker homologer Promotor des Hamsters. Ein solcher Promotor, der für die Herstellung heterologer Genprodukte in Hamsterzellen, insbesondere CHO-Zellen sehr vorteilhaft ist, wird hiermit erstmalig bereitgestellt. Insbesondere betrifft die Erfindung einen starken homologen Promotor des Hamsters, der in CHO-Zellen im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 eine größere Aktivität aufweist als der Thymidinkinasepromotor aus Herpes simplex. Vorteilhaft weist ein solcher Promotor eine Transkriptionsaktivität auf, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors. In der gleichen Größenordnung soll hier bedeuten, daß der erfindungsgemäße Promotor mindestens 50%, besser mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% der Aktivität des SV40-Promotors im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 hat. Bevorzugt ist ein solcher Promotor dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Besonders bevorzugt ist ein solcher Promotor, der eine Sp1-Bindungsstelle bei Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Ferner ist ein solcher Promotor bevorzugt, der konstitutiv aktiviert ist und insbesondere unter serumhaltigen, serumarmen und serumfreien Zellkulturbedingungen gleichermaßen aktiv ist. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich um einen induzierbaren Promotor, insbesondere um einen Promotor, der durch Serumentzug aktiviert wird. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform ist ein Promotor mit einer Sequenz, die in Abb. 5 enthalten ist. Besonders bevorzugt ist dabei eine Sequenz, die in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen –161 bis –45 gemäß Abb. 5 entspricht.

20

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines starken homologen Promotors des Hamsters exprimiert wird. In bevorzugten Ausführungsformen ist ein solcher Promotor durch Merkmale gekennzeichnet, wie sie im vorigen Absatz beschrieben wurden.

25

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Promotors, wie er vorstehend beschrieben wurde, zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen.

30

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Ub/S27a-Gen aus Hamster. Vorzugsweise hat ein solches Gen eine Sequenz gemäß Abb. 1 oder eine Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein solches Gen Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen, wie sie in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

35

Die beschriebenen Promotorsequenzen können in einer Expressionskassette in funktionellen Zusammenhang mit weiteren regulatorischen Sequenzen gebracht werden. Beispielsweise können sie mit Enhancer-Sequenzen funktionell verknüpft und so die Transkriptionsaktivität gesteigert werden. Dabei kann es sich um einen oder mehrere Enhancer und/oder mehrere Kopien einer Enhancer-Sequenz handeln. Beispielsweise kann dabei ein CMV- oder ein SV40-Enhancer verwendet werden. Der humane CMV-Enhancer gehört dabei zu den stärksten bisher identifizierten Enhancern. Ein Beispiel für einen induzierbaren Enhancer ist der Metallothionein-Enhancer, der durch Glukokortikoide oder Schwermetalle stimuliert werden kann. Eine weitere mögliche Modifikation wäre z. B. die Einführung vieler Sp1-Bindungsstellen. Die Promotorsequenzen können ferner mit regulatorischen Sequenzen kombiniert werden, die eine Steuerung/Regulierung der Transkriptionsaktivität gestatten. So kann der Promotor reprimierbar/induzierbar gemacht werden. Dies kann beispielsweise durch die Verknüpfung mit Sequenzen geschehen, die Bindungsstellen für positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren darstellen. Der oben genannte Transkriptionsfaktor SP-1 beispielsweise hat einen positiven Einfluß auf die Transkriptionsaktivität. Ein weiteres Beispiel ist die Bindungsstelle für das Aktivatorprotein AP-1, das sowohl in positiver als auch in negativer Weise auf die Transkription einwirken kann. Die Aktivität des AP-1 kann durch

40

45

50

55

60

65

verschiedenste Faktoren, wie z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Serum, gesteuert werden (Faisst et Meyer, 1992, und Referenzen darin). Die Transkriptionseffizienz kann auch dadurch gesteigert werden, daß die Promotorsequenz durch Mutation (Substitution, Insertion, Deletion) von einer, zwei, drei oder mehr Basen verändert wird und dann im CAT-Test gemäß Beispiel 4 gemessen wird, ob sich dadurch die Promotoraktivität erhöht.

- 5 Durch die in diesem Absatz beschriebenen Maßnahmen kann eine optimierte Expressionskassette erhalten werden, die von hohem Nutzen für die Expression heterologer Genprodukte, insbesondere in CHO-Zellen, ist. Eine durch eine oder mehrere solcher Maßnahmen erhaltene Expressionskassette ist daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

In DNaseI-Footprint- und Mutationsanalysen kann untersucht werden, welche Faktoren die Expression beeinflussen und ob die Promotoraktivität durch die Deletierung von möglicherweise vorhandenen negativen Kontrollelementen und durch die Einführung von weiteren positiven Kontrollelementen noch gesteigert werden kann. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben außerdem gezeigt, daß die Expression des Ub/S27a-Gens ganz offensichtlich durch verschiedene Faktoren reguliert werden kann. So zeigte die Gruppe um Shimbara, daß bei einer terminalen *in vitro* Differenzierung von humanen Leukämie-Zelllinien (HL-60, K562, U937, THO1) durch Zugabe von verschiedenen Substanzen wie TPA (12-O-Tetra-decanoylphorhol-13-acetat), DMSO, Retinsäure und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in das Kulturmedium die Expression des Ub/S27a-Gens herunterreguliert wird (Shimbara et al., 1993). Und die Gruppe um Wong stellte eine Überexpression des Ub/S27a-Gens in Carcinomazellen des Enddarms fest (Wong et al., 1993). Die Genexpression korrelierte dabei mit den klinischen Tumorstadien mit einer höheren Expression in weiter fortgeschrittenem Krebs.

- 20 Die Ausführung der Erfindung ist dem Fachmann in Kenntnis des Offenbarungsgehaltes dieser Anmeldung mit an sich bekannten Methoden sowie gemäß der Beispiele möglich.

Das komplette Ub/S27a-Gen, die 5'-untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens bzw. ausgewählte Fragmente davon können in Kenntnis der Sequenzen gemäß Abb. 1, 2 und 5 mit verschiedenen Standardmethoden erhalten werden. Aus der Sequenz gemäß Abb. 5 kann beispielsweise ein geeigneter Abschnitt ausgewählt und eine 25 Oligonukleotid-Sonde chemisch synthetisiert werden, die die Sequenz dieses Abschnitts hat (Sambrook et al., 11.3–11.44, 1989). Mit einer solchen Sonde kann durch Hybridisierung aus einer genetischen Bibliothek (Sambrook et al., 9.4–9.62, 11.45–11.61, 1989) des Hamsters das Ub/S27a-Gen bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kloniert werden. Die 5'-untranslatierte Region bzw. spezielle Fragmente davon können auch leicht durch PCR-Amplifikation mit entsprechenden Primern aus einer genetischen Bibliothek erhalten werden (Sambrook et al., 14.5–14.35, 1989). Diese Methode eignet sich besonders zur Herstellung ausgewählter Fragmente der Promotorregion, etwa des Bereichs von – 161 bis – 45 oder eines Abschnitts dieses Bereiches. Fragmente der 30 5'-untranslatierten Region wie etwa die in Tabelle 1 aufgeführten können auch durch limitierten Exonuklease III-Verdau aus größeren DNA-Fragmenten erhalten werden (Sambrook et al., 15.14–15.19; 5.84–5.85, 1989). Solche DNA-Moleküle können auch chemisch synthetisiert oder aus chemisch synthetisierten Fragmenten 35 durch Ligation erzeugt werden. Das Ub/S27a-Gen einer anderen Species, vorzugsweise Säugerspecies, bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kann durch Kreuzhybridisierung mit Sonden aus dem 5'-untranslatierten Bereich des Hamster-Ub/S27a-Gens oder etwa Sonden aus dem S27a-Anteil des Hamster-Ub/S27a-Gens isoliert werden.

Es steht im Stand der Technik eine Anzahl von Expressionsvektoren zur Verfügung, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen können an Stelle der in diesen Vektoren vorhandenen Promotorelemente integriert werden und so die Expression des jeweiligen Gens steuern, das mit diesem Vektor exprimiert werden soll. Kommerziell erhältliche Vektoren, die sich zur Integration des erfindungsgemäßen Promotors gut eignen, sind beispielsweise der pCAT-Basic Vector (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65322) oder der pCAT-Enhancer Vector, der zusätzlich noch einen SV40-Enhancer enthält (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65319). Ein Beispiel für einen promotorlosen Vektor ist das Plasmid pBL-CAT6 (Boshart et al., 1992; siehe auch Luckow et Schütz, 1987). Die erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können in die HindIII-, SphI-, PstI-, SalI-, XbaI-, BamHI-, BglII- oder XhoI-Restriktions-schnittstellen dieses Vektors ligiert werden und so mit dem in diesem Vektor enthaltenen Chloramphenicol-Transferase (CAT)-Gen funktionell verknüpft werden. Anstelle des CAT-Gens kann auch ein anderes Gen, etwa für Gewebspasminogenaktivator, in diesen Vektor integriert werden. Das CAT-Gen kann z. B. durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und ClaI aus dem Vektor pBL-CAT6 entfernt werden. Die dabei deletierte SV40 3' untranslatierte Region, die die Intronsequenz und das Polyadenylierungssignal enthält, kann ggf (d. h. sofern deren Funktion nicht durch die geneigten 3'-Sequenzen übernommen wird) nachfolgend wieder eingebaut werden, indem man z. B. diese SV40-Region mittels PCR amplifiziert und dabei gleich mit geeigneten Restriktions-schnittstellen an beiden Enden versieht, damit nachfolgende Umlonierungen, z. B. bei Einführung eines anderen gewünschten Genes, erleichtert werden. Eine andere Strategie der Auswechslung des CAT-Genes gegen ein anderes Gen ist, daß man zunächst mittels PCR und geeigneter mutagener Oligonukleotide eine singuläre Restriktions-schnittstelle am 5'-Ende der SV40-Region in den Vektor pBL-CAT6 einführt, die es 55 nachfolgend ermöglicht, gezielt das CAT-Gen zu entfernen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung des Vektors pLUC, der im Prinzip wie pBL-CAT6 aufgebaut ist, aber anstelle des CAT-Gen ein Luciferase-Reportergen enthält. Dieses läßt sich leicht durch einen XhoI/EcoNI-Doppelverdau entfernen, wobei die SV40-Sequenz im Vektor verbleibt.

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien mit hoher Expression des heterologen Gens wählt man vorteilhaft einen 60 Vektor, der die Selektion von Transformanden gestattet, die den Vektor in ihr Chromosom integriert und das integrierte heterologe Gen amplifiziert haben. Vektoren für solche Selektions-/Amplifikationsverfahren wie das DHFR/Methotrexat-Verfahren in DHFR-defizienten Zelllinien (z. B. CHO-DUKX) sind ebenfalls Stand der Technik (Sambrook et al., 16.9–16.15; 16.28–16.29, 1989).

Verfahren zur Einbringung der erhaltenen Vektoren in Wirtszellen ebenso wie die Selektion und Kultur der Transformanden kann der Fachmann Standardwerken entnehmen (z. B. Sambrooketal, 16.3—16.81, 1989).

Abgesehen von der Optimierung des Promoters bietet sich noch ein ganz anderer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Produktausbeute, und zwar über einen Gendosiseffekt. Mit steigender Kopienzahl der ins Genom integrierten Vektorkonstrukte sollte auch die Menge an produzierten Transkripten zunehmen. Eine spontane Amplifikation der eingeführten Konstrukte, die in einer stabilen Integration einer Vielzahl von Kopien resultiert, kann durch die Verwendung einer Sequenz mit amplifikationsfördernden Eigenschaften, sogenannten "amplification promoting sequences", erzielt werden. Eine solche Sequenz, die einen sehr hohen AT-Gehalt besitzt, war z. B. aus der nicht-transkribierten Intergenregion der ribosomalen Mausgene isoliert worden (Wegner et al., 1989) und wurde bereits erfolgreich zur stabilen und effizienten Inhibition der HIV-1 Replikation durch antisense RNA eingesetzt (Meyer et al., 1993). Ein 49 bp großer Sequenzbereich der Ub/S27a 5' untranslatierten Region (Position — 1477 bis — 1429; Abb. 4) mit einem hohen AT-Gehalt von 88% weist große Homologie zu den oben beschriebenen amplifikationsfördernden Sequenzen der Maus auf. Daß dieser CHO-Sequenzbereich ebenfalls solche Eigenschaften besitzt, kann durch den Einsatz von Ub/S27a-Promotorkonstrukten, denen diese CHO-Sequenz vorgeschaltet ist, überprüft werden.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1: Vergleich der DNA-Sequenz des kompletten Ubiquitin/S27a cDNA-Klons aus CHO-Zellen mit der humanen cDNA-Sequenz

Vergleich der CHO Ub/S27a cDNA-Sequenz mit der humanen cDNA-Sequenz (Adams et al., 1992). Identitäten innerhalb der Sequenz sind durch "*" hervorgehoben. Der Ubiquitinanteil ist durch Doppelstrichen über der Sequenz gekennzeichnet. Die Positionen der drei Introns sind durch Dreiecke markiert.

_____ Poly A Signal : : : Startkodon + + + Stoppkodon

Abb. 2: Aminosäuresequenz des Ubiquitinproteins Ub/S27a

Vergleich der aus der CHO cDNA-Sequenz abgeleiteten Ub/S27a-Aminosäuresequenz mit der humanen Aminosäuresequenz (Adams et al., 1992). Identitäten innerhalb der Sequenzen sind durch "*" gekennzeichnet. Die Ubiquitineinheit von 76 Aminosäuren ist durch Doppelstrichen über der Sequenz hervorgehoben.

Abb. 3: Analyse der Ub/S27a-Transkriptlevel in CHO-Zellen

Die denaturierte zytoplasmatische Gesamt-RNA (10 µg) von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurde in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Hybridisierungsprobe wurde die ³²P-markierte Ub/S27a-cDNA (508 bp) aus CHO eingesetzt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 3 Stunden.

- 1 + 3 serumkultivierte CHO-Zellen
- 2 + 4 serumfrei kultivierte CHO-Zellen
- 5 serumkultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert
- 6 serumfrei kultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert

Abb. 4: Strategie zur Sequenzierung der Ub/S27a 5' untranslatierten Region

Die 2.5 kb große 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens ist schematisch dargestellt. Es wurden sowohl subklonierte Restriktionsfragmente als auch durch Exonuklease III-Verdau erzeugte Deletionsklone sequenziert, wobei Ausmaß und Richtung der Sequenzierungen durch Pfeile angezeigt sind.

Abb. 5: Genomische DNA-Sequenz der Ub/S27a 5' untranslatierten Region

Zeichenerklärung:

5

		Restriktionsschnittstellen
	->	5' Ende der Promotordeletionsklone
10	*	3' Ende der Promotordeletionsklone
	~~~~~	Homologie zu amplifikationsfördernden Sequenzen
	*****	polypyrimidinreicher Sequenzbereich
15	:::	Startkodon
	+1, +13	durch S1 Nukleasekartierung bestimmte Transkriptionsstartstellen
	+85	über Primer-Extension erhaltenes 5' Ende
20	>>>>>	Spl-Bindungsstelle

Die Nukleotide sind in Relation zur Transkriptionsstartstelle, die mit +1 bezeichnet ist, numeriert. Die Restriktionsschnittstellen für SacII und EagI, die für GC-reiche Sequenzbereiche spezifisch sind, sowie die zu Subklonierungszwecken herangezogenen Restriktionsschnittstellen für EcoRI, HindIII und HinclII sind in der Sequenz durch Unterstreichung hervorgehoben. Zur Kennzeichnung der Intronsequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet. Die Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz wiedergegeben.

30 Abb. 6: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch Primer-Extension

Die Primer-Extensionsanalyse wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA von serumkultivierten CHO-Zellen durchgeführt (Bahn 1). Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA verwendet (Bahn 2). Der eingesetzte ³²P-endmarkierte Primer hybridisierte mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA (Nukleotide +256 bis +276 in der cDNA-Sequenz). Die Extensionsprodukte wurden in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde eine Sequenzierungsreaktion benutzt. Die Länge des Extensionsproduktes, dessen Position durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, betrug 304 Nukleotide.

40 Abb. 7: Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes durch S1 Nuklease-Kartierung

Eine der Gegenstrangsequenz entsprechende ³²P-endmarkierte Einzelstrangprobe, die den gesamten Bereich der 5' untranslatierten Region (-2289 bis +176) umfaßte, wurde mit 5 µg Gesamt-RNA (Bahn 2) bzw. zytoplasmatischer Gesamt-RNA (Bahn 3) aus serumkultivierten CHO-Zellen hybridisiert. Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA eingesetzt (Bahn 1). Die vor dem S1 Nuklease-Abbau geschützten Fragmente wurden in einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine Sequenzierungsreaktion, in der der zur eingesetzten Hybridisierungsprobe komplementäre DNA-Strang sequenziert wurde. Der zur Sequenzierung benutzte Primer hybridisierte dabei mit der Nukleotidsequenz von +157 bis +176. Die Positionen der abbaugeschützten DNA-Fragmente sind in der hervorgehobenen Sequenz durch Pfeile markiert. Dem distalen Transkriptionsstartpunkt wurde die Nukleotidposition +1 zugeordnet.

50 Abb. 8: Funktionelle Analyse der Ub/S27a-Promotoraktivität

Vektorkonstrukte, in denen serielle Deletionen der 5' flankierenden Region des Ub/S27a-Gens in beiden Orientierungen mit dem CAT-Reportergen fusioniert worden waren, wurden zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen das CAT-Reportergen unter der Kontrolle eines viralen Promoters stand. Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt.

Die relative CAT-Aktivität der verschiedenen Vektorkonstrukte ist als Prozent der CAT-Aktivität in pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen, die als 100% angenommen wurde, angegeben und repräsentiert den Mittelwert (Standardabweichung in allen Fällen ≤ 5%) aus den vier Transfektionsexperimenten. Sämtliche CAT-Aktivitäten wurden bezüglich eingesetzter Proteinmenge sowie Transfektionseffizienz, die durch Messung der β-Galactosidase-Aktivität des co-transfizierten Kontrollplasmides pCMVtklacZ bestimmt wurde, korrigiert.

- Kontrollplasmide: ohne Promotor oder virale Promotoren (tk, SV40)
- Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 5'-3' Orientierung in pBL-CAT6 5
- Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 3'-5' Orientierung in pBL-CAT6 10

## Beispiele

## Plasmide

Für die Durchführung sämtlicher Genmanipulationen wurde der Vektor pBluescript SK — verwendet (Stratagene Cloning Systems). Zur Expressionsanalyse wurden eukaryontische Expressionsvektoren eingesetzt, die das als Reportergen dienende bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Gen enthielten. Das CAT-Gen ist dabei mit verschiedenen viralen Promotoren fusioniert. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor (tk) des Herpes simplex Virus (Boshart et al, 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über Gen-Bank Accession No. M80483), in pCMVtkCAT der tk-Promotor in Kombination mit einem Enhancer des humanen Cytomegalievirus (CMV) (Christoph Winkler, Würzburg) und in pKSSV2CAT der SV40-Promotor (Tsonis et al, 1988). pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen (Boshart et al, 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über GenBank Accession No. M80484). Im Vektor pCMVtklacZ steht die Expression des bakteriellen  $\beta$ -Galactosidase-Gens unter der Kontrolle der CMV-Enhancer/tk-Promotorkombination (Christoph Winkler, Würzburg). 15  
20  
25

## Zellkultur

CHO-DUKX Zellen (Urlaub und Chasin, 1980) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F12 Medium (1 : 1), supplementiert mit 5% fötalem Kälberserum, in Roux-Flaschen in einem CO₂ begasbaren Brutschrank bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die serumfreie Kultivierung wurden CHO-DUKX Zellen verwendet, die langsam an ein Wachstum in Medium ohne Serum adaptiert worden waren und nun permanent in serumfreiem Medium kultiviert werden. Diese Zellen wurden als Suspensionskulturen in Spinnerflaschen in Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Ham's F12 Medium (1 : 1) kultiviert, das mit niedermolekularem Pepton (Aldag, Hamburg), Insulin und Transferrin (Canada Packars) supplementiert wurde. 30  
35

## Beispiel 1: Differentielle Hybridisierung rekombinanter CHO cDNA Genbanken

Unter Verwendung von polyadenylierter mRNA aus CHO-Zellen, die entweder in Serum oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurden zunächst zwei cDNA Genbanken in  $\lambda$ ZAPH, bestehend aus  $4.2 \times 10^6$  bzw.  $2.9 \times 10^5$  rekombinanten Phagenklonen, hergestellt. 40

Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaides und Stoeckert, 1990). Polyadenyierte mRNA von CHO-Zellen, die mit oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurde durch Affinitätschromatographie an einer Oligo(dT)-Cellulosesäule gewonnen (Sambrook et al, 1989). Zur Herstellung der cDNA wurde das cDNA Synthesekit von Pharmacia LKB verwendet, wobei zur Erststrangsynthese ein Oligo (dT)-Primer eingesetzt wurde. Die cDNA wurde in den EcoRI-verdauten Vektor  $\lambda$ ZAPII kloniert (Stratagene Cloning Systems). Filterduplikate der nicht-amplifizierten CHO cDNA Genbank aus serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurden durch differentielle Hybridisierung gescreent. Als Probe wurde Gesamt-cDNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen eingesetzt, die durch "random priming" (Prime a Gene labelling Kit; Promega Cooperation) mit ( $\alpha$ -³²P) dCTP (6000 Ci/mmol; Amersham International plc) markiert worden war. Die Hybridisierung wurde wie in der Northern Blot Analyse (s. u., Beispiel 2) beschrieben durchgeführt. Phagenplaques, die mit beiden cDNA-Proben eine starke Hybridisierung zeigten, wurden isoliert und nochmals einer differentiellen Hybridisierung unterzogen. Aus den rekombinanten  $\lambda$ ZAPII Phagen wurden Phagemide durch in vivo Exzision unter Einsatz des Helperphagens R408 gewonnen ( $\lambda$ ZAPII cloning kit-Protokoll; Stratagene Cloning Systems). 45  
50  
55

Ungleich 6000 Phagenklone wurden so gescreent. Insgesamt wurden 12 rekombinante Phagenklone isoliert, die eine besonders starke Hybridisierung mit beiden Gesamt-cDNA-Proben zeigten.

DNA-Sequenzen wurden nach der Didesoxymethode unter Verwendung des T7 Sequenzierungskits von Pharmacia LKB ermittelt. Als Primer wurden sowohl T3 und T7 Promotorprimer als auch genspezifische Primer eingesetzt. In allen Fällen wurden die DNA-Proben mit [ $\alpha$ -³⁵S] dATP bzw. [ $\alpha$ -³⁵S] dCTP (10  $\mu$ Ci; Amersham International plc) markiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6%igen Polyacrylamid-Sequenzierungsgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sequenzanalyse wurden die Datenbanken von GenBank und EMBL herangezogen. 60

Einer der isolierten cDNA-Klone kodierte für ein Fusionsprotein, Ub/S27a, bestehend aus einer Ubiquitin-Monomereinheit und einem ribosomalen Protein der kleinen Untereinheit, S27a (Abb. 1). Die größte Homologie besteht mit der humanen Ub/S27a-Sequenz (Adams et al, 1992) mit 92.2% Homologie auf cDNA-Ebene und 100% Homologie auf Aminosäure-Ebene. Die isolierte CHO Ub/S27a cDNA ist 508 bp groß und umfaßt die gesamte Kodierregion sowie ein Polyadenylierungssignal im 3' untranslatierten Bereich und zwei einander

überlappende Translationsinitiationselemente in der 5' untranslatierten Region (Abb. 1). Anhand der cDNA-Sequenz wird auch ersichtlich, daß es sich um ein echtes Fusionsgen handelt, d. h. beide Proteinanteile werden von einem einzigen Gen kodiert. Die Proteinsequenz des resultierenden Fusionsproteins ist hoch konserviert, wobei die ersten 76 Aminosäuren des 156 Aminosäure großen Proteins den Ubiquitinanteil umfassen (Abb. 2).

5

### Beispiel 2: Analyse der Ub/S27a-Genexpression

Das Ausmaß der Ub/S27a-Genexpression wurde in Northern Blot Experimenten, in denen zytoplasmatische Gesamt-RNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen verwendet wurde, untersucht.

Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaides und Stoeckert, 1990). Gesamt-RNA (10 µg) wurde elektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham International plc) transferiert (Sambrook et al., 1989) und durch eine 5minütige UV-Bestrahlung (254 nm) kovalent mit der Nylonmembran vernetzt. Die RNA-Filter wurden über Nacht bei 65°C in einer Lösung bestehend aus 4 × SSC, 10 × Denhardt, 0.1% SDS und 1 × 10⁶ cpm/ml ³²P-markierter cDNA-Probe hybridisiert. Die cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von "random primer" markiert (Prime a Gene labeling kit; Promega Corporation), wobei die spezifische Aktivität der DNA-Proben 4–8 × 10⁸ cpm/µg DNA betrug. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal in 0.2 × SSC/0.1% SDS bei 65°C für 20 Minuten gewaschen. Auf die in Haushaltsfolie eingewickelten Filter wurde ein Röntgenfilm (Curix; Agfa-Gevaert N.V.) gelegt und die Autoradiographie für 3 Stunden bei –70°C durchgeführt.

Sowohl in den unter Standardbedingungen mit Serum kultivierten CHO-Zellen als auch in den an das Wachstum in serumfreiem Medium adaptierten CHO-Zellen ließen sich Ub/S27a-Transkripte mit einer Länge von ungefähr 600 Nukleotiden in großer Zahl und gleichen Mengen nachweisen (Abb. 3). Bei den beiden zusätzlichen Transkripten von ungefähr 1500 und 2800 Nukleotiden handelt es sich um Polyubiquitintranskripte, in denen mehrere Ubiquitin-Monomereinheiten miteinander fusioniert sind. Die Polyubiquitintranskripte, die unter diesen Kulturbedingungen zu einem erheblich geringeren Level exprimiert werden, hybridisieren mit dem Ubiquitinanteil der in den Northern Blot Analysen als Probe eingesetzten Ub/S27a cDNA. Der Ub/S27a Transkriptlevel blieb unverändert hoch, wenn die permanent in serumfreiem Medium wachsenden CHO-Zellen für 24 h in serumhaltigem Medium kultiviert wurden (Abb. 3). Ein anderes Bild bot sich, wenn die unter Standardbedingungen serumkultivierten CHO-Zellen für 24 h in serumfreies Medium überführt wurden. Die Zahl der Ub/S27a-Transkripte nahm erheblich ab (Abb. 3). Dieses ist darauf zurückzuführen, daß sich der überwiegende Teil der CHO-Zellen während dieser 24stündigen Kultivierungsphase in serumfreiem Medium nicht mehr teilten und zudem eine Reduktion im Zellvolumen aufwiesen. In Zellen, die ein solches Stadium erreicht haben, findet, wenn überhaupt, nur noch eine geringe Transkription statt.

35

### Beispiel 3: Isolierung und Analyse der Ub/S27a-Promotorregion

Zur Isolierung der Promotorregion des Ub/S27a-Gens wurde zunächst eine genomische CHO-Genbank mit über eine Million rekombinanter Phagenklone hergestellt, wobei genomische DNA von serumkultivierten CHO-Zellen verwendet wurde.

Die genomische DNA wurde von NP40-lysierten Zellen nach einem Protokoll von Nicolaides und Stoeckert gewonnen (Nicolaides & Stoeckert, 1990). Im Gegensatz zu der beschriebenen Ausalzungsmethode wurde die DNA jedoch nach dem Proteinase K1 Verdau dreimal mit Phenol/ Chloroform extrahiert.

Die DNA-Enden von partiell mit Sau3AI verdauter genomischer DNA mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 20 kb wurden halbseitig unter Verwendung von dGTP und dATP aufgefüllt und mit Xhol-verdautem Vektor λGEM-12 (halbseitig mit dITP und dCTP aufgefüllte DNA-Enden; Promega Corporation) ligiert. Zur Verpackung wurden kommerziell erhältliche Extrakte eingesetzt (Gigapack II Plus packaging extracts; Stratagene Cloning Systems).

Diese genomische Genbank wurde lediglich mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a-cDNA hybridisiert, um eine Kreuzhybridisierung mit den Polyubiquitingenen zu vermeiden. Einer der isolierten Genomklone mit einer Gesamtlänge von 14 kb enthielt unter anderem die komplette Kodierregion und 2.5 kb der 5' untranslatierten Region. Die Kodierregion wird durch drei Introns mit korrekten Konsensussequenzen an den Exon/Intron- und Intron/Exon-Übergängen unterbrochen (Breathnach & Chambon, 1981), wobei zwei dieser Introns im Ubiquitinanteil und das dritte Intron im S27a-Anteil lokalisiert sind (Abb. 1).

Beide DNA-Strände der 5' untranslatierten Region wurden komplett sequenziert (Methode s. Beispiel 1). Das geschah durch Sequenzierung von subklonierte Restriktionsfragmenten sowie durch Sequenzierung von überlappenden Deletionsklonen, die durch Exonuklease III Verdau erzeugt worden waren (Abb. 4). Die potentielle Promotorregion enthält keine TATA-Box, dafür aber einen CpG-reichen Sequenzbereich (67% GC von –144 bis +129), in dem auch die singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 (Dynan & Tjian, 1983) und je eine Restriktionsschnittstelle für EagI und SacII, die für solche GC-reiche Regionen spezifisch sind, liegen, sowie polypyrimidinreiche Sequenzbereiche (Abb. 5).

Zur Lokalisierung des Transkriptionsstartpunktes wurden sowohl Primer-Extension als auch S1 Nuklease-Kartierung an Gesamt-PNA von serumkultivierten CHO-Zellen vorgenommen. Um eine Extension von Polyubiquitin-Transkripten zu vermeiden, wurde für die Primer-Extension ein Primer verwendet, der mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA hybridisierte (komplementär zu den Nukleotiden +256–276 bp in der cDNA-Sequenz).

Ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GTGGTGTAGGACTTCTCTTC-3', komplementär zu den Nukleotiden +256 bis +276 in der Ub/S27a cDNA-Sequenz, wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA aus serumkul-

tivierten CHO-Zellen hybridisiert und verlängert (Ausubel et al, 1987).

Die zur S1 Nuklease-Kartierung eingesetzte Einzelstrangprobe, die den Bereich von -2289 bis +176 der genomischen Ub/S27a-Sequenz umfaßte, wurde über PCR wie folgt gewonnen. Die 5' untranslatierte Region der Ub/S27a-Genomsequenz (-2289 bis +240) wurde in 5'-3' Orientierung in den Vektor pBluescript SK — (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Dieses Hybridplasmid wurde in der PCR als Matrize eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden ein biotinylierter T3-Promotorprimer und ein mit [ $\gamma$ -³²P] ATP-markierter Ub/S27a-spezifischer Primer (5'-CTCGAGCGTGATCGTTTCC-3', komplementär zu den Nukleotiden +157 bis +176 der Ub/S27a-Genomsequenz) verwendet. Die Gewinnung des zur RNA-Sequenz komplementären Einzelstranges erfolgte durch alkalische Denaturierung des an magnetische Streptavidinbeads gebundenen PCR-Produktes (Dynabeads M-280 Streptavidin Protokoll; Dynal A.S., Norway).  $2 \times 10^5$  cpm der Einzelstrangprobe wurden mit 5  $\mu$ g Gesamt-PNA aus serumkultivierten CHO-Zellen über Nacht bei 55°C hybridisiert und die Hybridisierungsprodukte wurden nachfolgend mit S1 Nuklease behandelt (Ausubel et al, 1987).

Das über Primer-Extension erhaltene Produkt wies eine Länge von 304 Nukleotiden auf (Abb. 6), womit der Transkriptionsstartpunkt 44 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb eines Polypyrimidinelements liegen würde (Abb. 5). Dieser Startpunkt konnte durch die S1 Nuklease-Kartierung allerdings nicht verifiziert werden. Über die S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei Transkriptionsstartpunkte ermittelt (Abb. 7), die 128 bp bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb einer Polypyrimidinsequenz liegen und deren Positionen im nachfolgenden als Position +1 und +13 angegeben werden (Abb. 5, Abb. 7). Die wahrscheinlichste Erklärung für die zu beobachtende Diskrepanz zwischen den beiden Kartierungsmethoden ist eine vorzeitige Terminierung der Primer-Extensionsreaktion. Bedingt durch die Positionierung des Primers in der S27a-Sequenz liegt die Länge des zu erwartenden Extensionsproduktes mit über 300 Basen über der optimalen Länge von ungefähr 100 Basen. Je größer die Entfernung zwischen der Primerposition und der gesuchten Transkriptionsstartstelle ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines vorzeitigen Abbruchs der reversen Transkription durch GC-reiche Sequenzen und Sekundärstrukturausbildungen innerhalb der mRNA. Für die S1 Nuklease-Kartierung wurde hingegen eine den gesamten 5' untranslatierten Bereich umfassende Einzelstrangprobe eingesetzt (Sequenzbereich -2289 bis +176; Abb. 5), die aus einem PCR-Produkt gewonnen wurde, wodurch die bei der Primer-Extension auftretenden Probleme der reversen Transkription von GC-reichen Sequenzen umgangen wurden.

Unsere Untersuchungen der 2.5 kb großen 5' untranslatierten Region zeigten, daß der mögliche Promotor weder eine TATA-Box noch eine CAAT-Box besaß. Dafür aber zeichnete sich die stromaufwärts vom Startkodon gelegene Sequenz durch einen hohen GC-Gehalt aus. Innerhalb dieser Sequenz wurde eine singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 vorgefunden. Über S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei prominente Transkriptionsstartpunkte, die innerhalb einer Polypyrimidinsequenz 128 bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon lagen, identifiziert.

#### Beispiel 4: Identifizierung und Eingrenzung des Sequenzbereiches mit Promotoraktivität

35

#### Herstellung von Deletionsklonen durch Exonuklease III Verdau

Über Exonuklease III-Verdau wurde eine Serie von 5' Deletionsklonen hergestellt (Tab. 1). Die 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens (-2289 bis +240) wurde dazu in beiden Orientierungen in die HinclII-Schnittstelle des Vektors pBluescript SK — (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Zur Einführung von unidirektionalen Deletionen wurden diese Hybridplasmide mit KpnI und XbaI verdaut und mit Exonuklease III, wie in dem Protokoll des eingesetzten "Erase-a-base"-Kits beschrieben (Promega Corporation), behandelt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden als BamHI-Fragmente in die singuläre BamHI-Schnittstelle des Vektors pBL-CAT6 integriert.

40

Vor Beginn des Exonuklease III-Verdaus kann der Vektor pBluescript Sk — auch durch Einführung von Adaptoren, die geeignete Restriktionsschnittstellen enthalten, modifiziert werden, um nachfolgende Genklonierungsexperimente zu erleichtern. So können neben BamHI auch noch andere Restriktionsenzymeschnittstellen zu Klonierungszwecken herangezogen werden, z. B. nach dem Schema

45

50

NotI-XbaI-SpeI-BamHI-SmaI-EcoRI-3' Ende ..... 5' Ende-SalI/HincII-BamHI

#### 5' Deletionsfragment

55

60

65

Tab. 1: Zusammenstellung der durch Exonuklease III-Verdau hergestellten 5' Deletionsklone der Ub/S27a 5' untranslatierten Region

5'	5' Deletionsfragment	5' Ende des Fragmentes	3' Ende des Fragmentes
10	1612 bp	Position - 1501	Position + 111
15	806 bp	Position - 695	Position + 111
20	483 bp	Position - 372	Position + 111
25	272 bp	Position - 161	Position + 111
30	156 bp	Position - 45	Position + 111

Die Positionsangaben beziehen sich auf die Numerierung der in Abb. 5 dargestellten genomischen Ub/S27a-Sequenz.

Alle Deletionsklone haben ein gemeinsames 3' Ende (Position +111), das zwischen den Transkriptionsstartstellen und dem Startkodon liegt (Abb. 5). Das größte Fragment umfaßt 1.7 kb und das kleinste Fragment 150 bp (Tab. 1). Letzteres ist das einzige Fragment, das nicht mehr die singuläre Sp1-Bindungsstelle enthält. Diese potentiellen Promotorregionen wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pBL-CAT6 vor das promotorlose CAT-Gen, das als Reportergen diente, kloniert und zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt.

#### DNA-vermittelte Zelltransfektion und CAT-Assay

Am Vortag der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 20 cm² Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA (CAT-Reporterkonstrukte) und 500 ng des Plasmides pCMVtklacZ unter Verwendung einer modifizierten Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (Chen & Okayama, 1987). Die β-Galactosidase-Aktivität des Kontrollvektors pCMVtklacZ wurde dabei zur Bestimmung der Transfektionseffizienz herangezogen. Überschüssiges DNA-Präzipitat wurde nach 4ständiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch Waschen mit PBS entfernt.

Nach einer Inkubationsperiode von 48 Stunden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurde je 1 ml eiskalter NTE-Puffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA) in die Schalen gegeben und die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers von den Schalen abgelöst und in Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden durch 3minütige Zentrifugation bei 9000 rpm pelletiert, in 70 µl 0.25 M Tris-HCl pH 7.8 resuspendiert und bei -70°C gelagert. Für die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität nach der Methode von Sleigh wurden jeweils 30 µl der Zellsuspension eingesetzt (Sleigh, 1986). Eine Normalisierung der relativen CAT-Aktivität jeder Transfektion wurde auf der Basis der nach der Methode von Norton und Coffin bestimmten β-Galactosidase-Aktivität vorgenommen (Norton & Coffin, 1985). Für diesen Test wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension eingesetzt. In allen Fällen wurde außerdem eine Korrektur bezüglich der eingesetzten Proteinmenge vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde dabei nach der Bradford-Methode bestimmt (Ausubel et al., 1987).

In dem Histogramm in Abb. 8 sind die Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten transienten Expressionsexperimenten dargestellt. Zur Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen die CAT-Genexpression durch einen konstitutiven viralen Promotor gesteuert wird. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor des Herpes simplex Virus. In pCMVtkCAT liegt dieser Promotor in Kombination mit einem Enhancer des humanen Cytomegalievirus vor und in pKSSV2CAT handelt es sich um den SV40-Promotor. pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen.

Mit Ausnahme des 156 bp Fragmentes zeigten alle Ub/S27a-Fragmente, die in 5'-3' Orientierung vor das promotorlose CAT-Reportergen kloniert worden waren, eine starke Promotoraktivität, die 2.5 bis 3mal höher war als die des tk-Promotors des Herpes simplex Virus (Abb. 8). Die stärkste Promotoraktivität, die mit der des SV40-Promotors in pKSSV2CAT vergleichbar war, wiesen dabei die Fragmente von 483 bp und 272 bp auf. Lediglich die virale CMV-Enhancer/tk-Promotor-Kombination in pCMVtkCAT resultierte in einer noch um ungefähr 10% höheren CAT-Aktivität. Bei einer bis zur Position -45 reichenden Deletion (156 bp Fragment), die auch die singuläre Sp1-Bindungsstelle umfaßte, war keine CAT-Aktivität mehr feststellbar (Abb. 8). Die Ub/S27a 5' untranslatierte Region, die für die Vermittlung einer starken Promotoraktivität ausreichend ist, läßt sich somit auf den Bereich von -161, dem 5' Ende des 272 bp Fragmentes, bis -45, dem 5' Ende des 156 bp Fragmentes, eingrenzen. Innerhalb dieses 117 bp umfassenden Bereiches liegt auch die singuläre Sp1-Bindungsstelle.

Ein unerwartetes Resultat war die Beobachtung, daß die kürzeren Fragmente auch in der 3'-5' Orientierung eine Promotoraktivität aufwiesen (Abb. 8). Allerdings ist dieser auf dem Gegenstrang lokalisierte Promotor nicht so stark wie der Ub/S27a-Promotor, sondern um 42% reduziert. Auch hier zeigten die Fragmente von 483 bp und 272 bp die größte Aktivität. Diese Aktivität war mit der des tk-Promotors in pBL-CAT5 vergleichbar.

Das zugehörige Gen, dessen Expression von diesem Gegenstrangpromotor aus gesteuert wird, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Es könnte sich also bei dem oben erwähnten 117 bp Promotorbereich sogar um eine bidirektionale Promotorregion handeln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit dem von den Erfindern der vorliegenden Erfindung isolierten Ub/S27a-Promotor aus CHO-Zellen erstmals ein sehr starker konstitutiver homologer Promotor des Hamsters bereitgestellt wird. Untersuchungen an stabil transfizierten serumkultivierten CHO-Zellen belegen, daß der Ub/S27a-Promotor auch nach der Integration in das Zellgenom äußerst aktiv ist und für eine sehr starke Expression des CAT-Reportergenes sorgt. 5

## Literatur

10

- Adams, S.M., Sharp, M.G., Walker, R.A., Brammar, W.J. & Varley, J.M. (1992)  
Differential expression of translation-associated genes in benign and malignant human breast tumours  
Br.J.Cancer 65, 65—71
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. & Struhl, K. (1987)  
Current protocols in molecular biology Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 15
- Baker, R.T. & Board, P.G. (1991)  
The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes  
Nucleic Acids Research 19, 1035—1040
- Boshart, M., Klüppel, M., Schmidt, A., Schütz, G. & Luckow, B. (1992)  
Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene  
Gene 110, 129—130
- Breathnach, R. & Chambon, P. (1981)  
Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins 20  
Ann.Rev.Biochem. 50, 349—383
- Chen, C. & Okayama, H. (1987)  
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA  
J. Mol. Cell. Biol. 7, 2745—2752
- Ciechanover, A. (1994)  
The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway 30  
Cell 79, 13—21
- Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983)  
The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter  
Cell 35, 79—87
- Faisst, S. & Meyer, S. (1992)  
Compilation of vertebrate-encoded transcription factors  
Nucleic Acids Research 20, 3—26
- Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. (1989)  
The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis 40  
Nature 333, 394—401
- Fornace, A.J., Mama, I., Hollander, M.C. & Lamoreaux, E. (1989)  
Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells
- Nucleic Acids Research 17, 1215—1230
- Huxley, C. & Fried, M. (1990)  
The mouse rPL7a gene is typical of other ribosomal protein genes in its 5' region but differs in being located in a tight cluster of CpG-rich islands 45  
Nucleic Acids Research 18, 5353—5357
- Jentsch, S., Seufert, W. & Hauser, H.-P. (1991)  
Genetic analysis of the ubiquitin system  
Biochimica et Biophysica Acta 1089, 127—139
- Kaufman, R. J. (1987)  
High level production of proteins in mammalian cells  
In: Genetic Engineering: Principles and methods (Hrsg. J K Setlow), Bd. 9, S. 155
- Plenum Publishing, New York 55
- Luckow, B., Schütz, G. (1987)  
CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements  
Nucleic Acids Res. 15, 5490
- Luo, X. & Kim, K.-H. (1990)  
An enhancer element in the house-keeping promoter for acetyl-CoA carboxylase gene 60  
Nucleic Acids Research 18, 3249—3254
- Meyer, J., Nick, S., Stamminger, T., Grummt, F., Jahn, G. & Lipps, H.J. (1993)  
Inhibition of HIV-1 replication by a high-copy-number vector expressing antisense RNA for reverse transcriptase 65  
Gene 129, 263—268
- Nicolaides, N.C. & Stoeckert, C.J. (1990)  
A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells

- BioTechniques 8, 154—155  
 Norton, P.A. & Coffin, J.M. (1985)  
 Bacterial p-galactosidase as a marker of Rous Sarcoma virus gene expression and replication  
 Mol. Cell. Biol. 5, 281—290
- 5 Redman, K.L. & Rechsteiner, M. (1989)  
 Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a  
 Nature 338, 438—440
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)  
 Molecular cloning: A Laboratory Manual
- 10 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY  
 Schlesinger, M.J. & Bond, U. (1987)  
 Ubiquitin genes  
 Oxf Survey Euk. Genes 4, 77—91
- Shimbara, N., Sato, C., Takashina, M., Tanaka, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1993)  
 15 Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells  
 FEBS Letters 322, 235—239
- Sleigh, M.J. (1986)  
 A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in eukaryotic cells  
 Anal. Biochem. 156, 252—256
- 20 Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1980)  
 Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity  
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216—4220
- Tsonis, P.A., Manes, T., Millan, J.L. & Goetinck, P.F. (1988)  
 25 CAT constructs with convenient sites for cloning and generating deletions  
 Nucleic Acids Research 16, 7745
- Wegner, M., Zastrow, G., Klavinius, A., Schwender, S., Müller, F., Luksza, H., Hoppe, J., Wienberg, J. & Grummt, F.  
 (1989)  
 Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells:  
 implication of HMG-I in their function
- 30 Nucleic Acids Research 17, 9909—9932  
 Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. & Vuust, J. (1985)  
 The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences  
 EMBO J. 4, 755—759
- 35 Wong, J.M., Mafune, K., Yow, H., Rivers, E.N., Ravikumar, T.S., Steele, G.D. & Chen, L.B. (1993)  
 Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth respon-  
 se gene  
 Cancer Research 53, 1916—1920

## Patentansprüche

- 40 1. Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthält.  
 2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ubiquitin-S27a-Gen des Hamsters abgeleitet sind.
- 45 3. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.  
 4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3, wobei die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen —161 bis —45 gemäß Abb. 5 entspricht.
- 50 5. Nukleinsäuremolekül, das eine Promotorsequenz enthält, die aus der Sequenz gemäß Abb. 5 durch Substitution, Insertion oder Deletion von einer, zwei, drei oder mehr Basen ableitbar ist, ohne daß durch diese Substitution, Insertion oder Deletion die Promotoraktivität deutlich erniedrigt wird.  
 6. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es einen oder mehrere Enhancer enthält, der/die mit der Promotorsequenz funktionell verknüpft ist/sind.
- 55 7. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es regulatorische Sequenzen enthält, über die die Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz reguliert werden kann.  
 8. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen mit einem Gen funktionell verknüpft sind.
- 60 9. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für Gewebeplasminogen-aktivator, second-generation-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, oder Mangan-Superoxiddismutase kodiert.  
 10. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Expressionsvektor ist.
- 65 11. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor durch Rekombination in das Genom von eukaryontischen Wirtszellen, vorzugsweise Hamsterzellen, besonders bevorzugt CHO-Zellen, integriert werden kann.  
 12. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine amplifikationsfördernde Sequenz enthält.
13. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 12 eingeführt wurde.

# DE 195 39 493 A1

14. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül eingeführt wurde, das das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Hamster-Ub/S27a-Gens enthält.
15. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das synthetisierte Genprodukt isoliert wird. 5
16. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens exprimiert wird. 10
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/ oder regulatorischen Sequenzen in der Abb. 5 enthalten sind.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen –161 bis –45 gemäß Abb. 5 entspricht.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Gen für Gewebeplasminogenaktivator, second-generation-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, oder Mangan-Superoxiddismutase kodiert. 15
20. Starker homologer Promotor des Hamsters.
21. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die größer ist als diejenige des Thymidinkinasepromotors aus Herpes simplex. 20
22. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors.
23. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer CAAT-Box, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. 25
24. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sp1-Bindungsstelle, aber keine TATA-Box aufweist.
25. Promotor nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten ist. 30
26. Promotor nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß er in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen –161 bis –45 gemäß Abb. 5 entspricht.
27. Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines Promotors gemäß einem der Ansprüche 21 bis 26 exprimiert wird. 35
28. Verwendung eines Promotors nach einem der vorangegangenen Ansprüche zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen.
29. Ub/S27a-Gen aus Hamster.
30. Ub/S27a-Gen nach Anspruch 29 mit der Sequenz gemäß Abb. 1 oder einer Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert. 40

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

45

50

55

60

65

92.2% Homologie

Poly A Signal : Startkodon : Stoppkodon

Abb. 1

Mensch	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG *****	35
CHO	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG	35
	=====	
Mensch	IPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV *****	70
CHO	IPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV	70
	=====	
Mensch	LRLRGGAKKRKKSYTPKKNKHKRKVKLAVLV *****	105
CHO	LRLRGGAKKRKKSYTPKKNKHKRKVKLAVLV	105
	=====	
Mensch	YKVDENGKISRLRRECPSSDECAGVFMASHFDRHY *****	140
CHO	YKVDENGKISRLRRECPSSDECAGVFMASHFDRHY	140
	=====	
Mensch	CGKCCLTYCFNKPEDK *****	156
CHO	CGKCCLTYCFNKPEDK	156

100% Homologie

Abb. 2

1 2 3 4 5 6

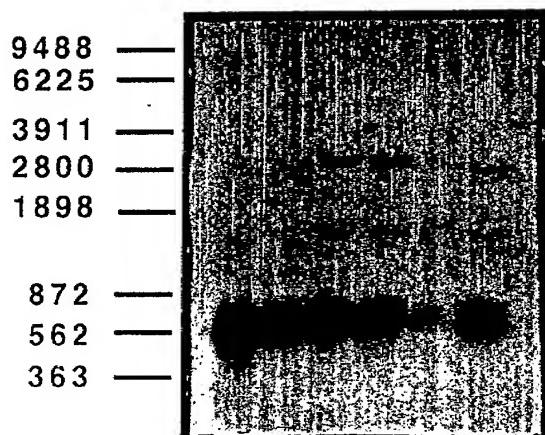


Abb. 3

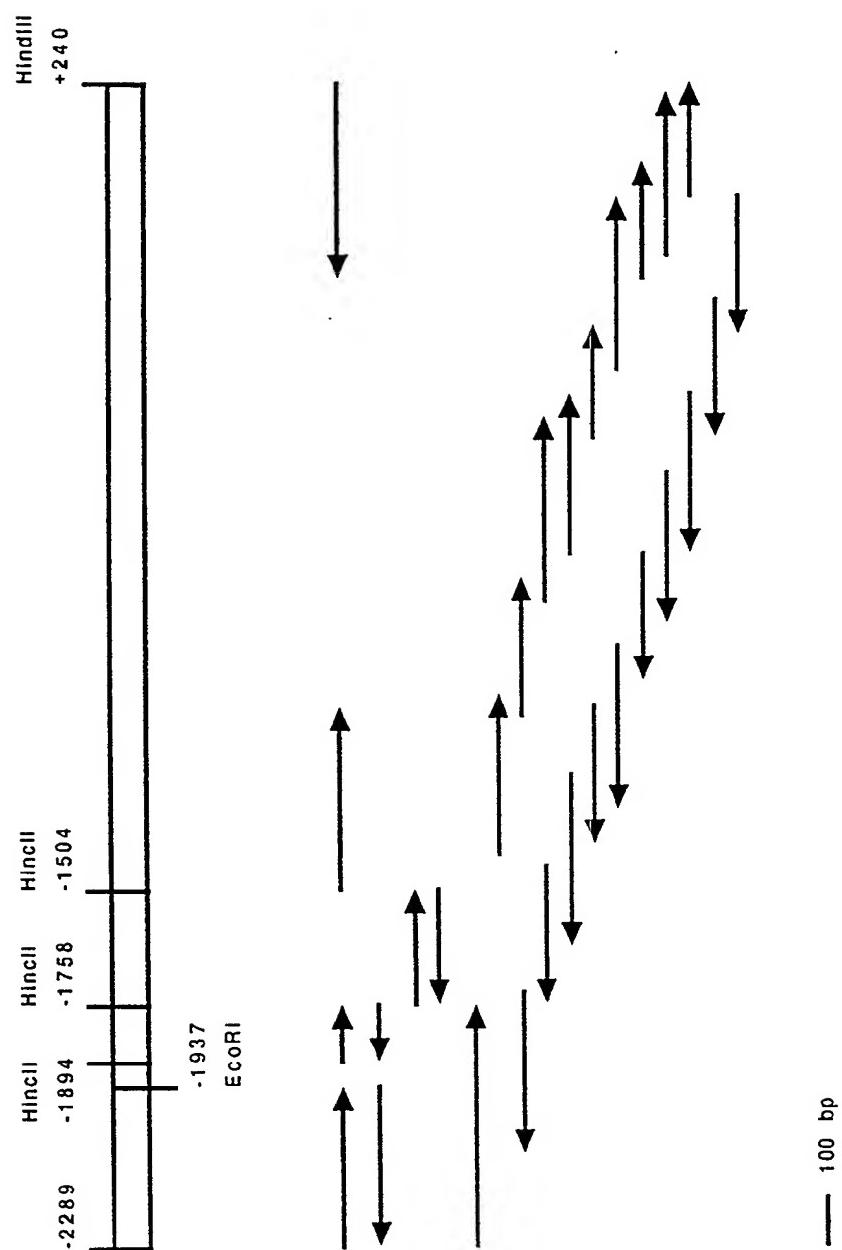
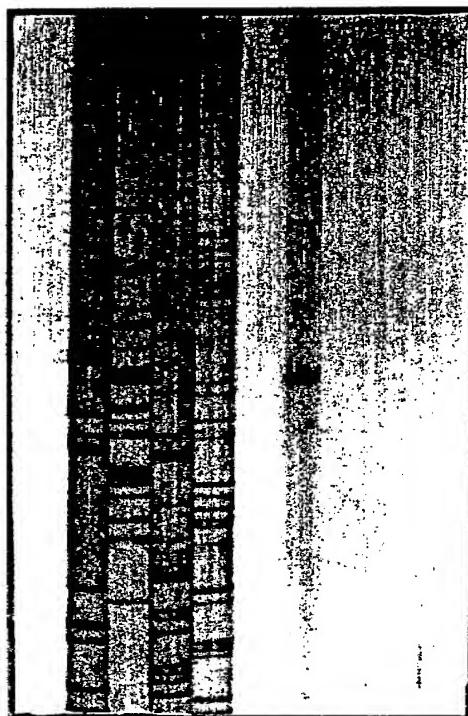


Abb. 4

GATCTCCAGGACAGCCATGGCTATTACACAGAGAAACCTGTCTGGAAAA	- 2240
ACAAAAAAATTAGTGTCCATGTGTAAATGTGTGGAGTATGCTTGTCACTGCC	- 2190
ACATACAGAGGTAGAGGGCAGTTATGGGAGTCAGTTCCATTCTTCCTT	- 2140
TATGGGGACCTGGGACTGAACTCAGGTCACTCAGGCTGGCAGAAAGTG	- 2090
CATTAGCTCACGGAGCCTTATCATTGGCAAAGCTCTCAAGTAGAAAAA	- 2040
TCAATGTGTTGCTCATAGTCAATCATTATGTTCGAGAGGGAAAGGGT	- 1990
ACAATCGTTGGGCATGTGTGGTCACATCTGAATAGCAGTAGCTCCCTAG	- 1940
<u>GAGAATTCCAAGTTCTTGGTGGTGTATCAATGCCCTAAAGGGTCAAC</u>	- 1890
 EcoRI	
HincII	
AACTTTTTTCCCTCTGACAAA ACTATCTTCTTATGTCCTTGTCCCTCAT	- 1840
ATTGAAAGTATTTTATTCTTGCAGTGTGAATATCAATTCTAGCACCTC	- 1790
AGACATGTTAGGTAAGTACCCCTACAACCTCAGGTTAACTAATTAAATTAA	- 1740
 HincII	
CTAATTAAACCCCAACACTTTCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	- 1690
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	- 1640
GTGTGTGTGCCGCCGCCGCTCGGATCATTCTACCTTTGTTAAAAAATG	- 1590
TTAGTCCAGGGTGGGTGCACTGTGAAAGTCTGAGGGTAACTTGCTGGG	- 1540
-> 1612 bp	
GTCAGTTCTTCCACTATAGGACAGA <u>^CTCCAGGTGTCAACTCTTACTG</u>	- 1490
 HincII	
ACAGAACCATCCAAATAGCCCTATCTAATTAGTTTTTATTATTAT	- 1440
^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TTTTGTTTCGAGACAGGGTTCTCTGTGGCTTGGAGGCTGTCCCTGG	- 1390
^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
AACTAGCTCTGTAGACCAGGGCTCGACTCAGAGATCCACCTGCC	- 1340
TCTGCCTCTGAGTGCTGGATTAAAGGCATGCGCCACCAACGCTTGGCT	- 1290
CTACCTAATTAAAAGAGATTGTGTGTACAAGGGTGTATGTCGCCCT	- 1240
GCAACCACCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAAAACTTCACTGAAGCTGA	- 1190
AGCACGATGATTGGTTACTCTGGCTGGCAATGAGCTCTAGGGAGTCTC	- 1140
CTGTCAAACAGAACTCAACAGGCCAGCAGTCTTTAAAGTGGGTT	- 1090
ACAACACAGGTTTGCAATCAGGCATTATCTAAGCTATTCCCAGC	- 1040
CAAAATGTGTATTGGAGGCAGCAGAGCTAATAGATTAAAATGAGGGA	- 990
AGAGCCCACACAGGTTATTAGGAAGATAAGCATCTTCTTATATAAAACA	- 940
AAACCAAACCAAACGGAGGTCTACCTTAGGGATGGAAGAAAAGAC	- 890
ATTTAGAGGGTGCAATAGAAAGGGCACTGAGTTGTGAGGTGGAGGACTG	- 840
GGAGAGGGCGCAACCGCTTAACTGTCCCTGTTGCCTATTGGGGA	- 790

CAGCACATGTTCCCTATTTCCCAGGATGGGCAATCTCCACGTCCAAACT	-	740
	->	806 bp
TGGGGTGCAGGACTACAGTCATTTGCAGGTTCTTACTGTATGGCTTT	-	690
TAAAACGTCAAAGGTGACCATTAAACCGTTCTACGCTGGAGGGCACGTG	-	640
CGGCTCAGATGCTTCCTCTGACTGAGGGCCAGGAGGGGCTACACGGAAG	-	590
AGGCCACACCCGCACTTGGGAAGACTCGATTGGGCTTCAGCTGGCTGAG	-	540
ACGCCCCAGCAGGCTCCTCGGCTACACCTTCAGCCCCGAATGCCTTCCGG	-	490
CCCATAACCCCTCCCTCTAGGCATTCCGGCGAGGACCCACCCCTCGCGC	-	440
CAAACATTGGCCCCATCCCCGGTCTCACCTGAATCTCTAACTCTGGA	-	390
	->	483 bp
CTCCAGAGTTAGAGACTATAACCAGATAGCCCGATGTGTGAACTGCA	-	340
TCTTGGGACGAGTAGTTAGCAAAAAGAAAGCGACGAAAAACTACAATT	-	290
CCCAGACAGACTTGTGTTACCTCTCTCATGCTAAACAAGCCCCCTTT	-	240
AAAGGAAAGCCCCCTTTAGTCGCATCGACTGTGTAAGAAAGGCCTTGAA	-	190
	->	272 bp
ACATTTAATGTTGGCACACCGTTTCGAGGACCGAAATGAGAAAGAGCA	-	140
TAGGGAAACGGAGCGCCCGAGCTAGTCTGGCACTGCGTTAGACAGCCCGCG	-	90
	SacII	
	->	156 bp
GTCGTTGCAGCGGGCAGGCAC TTGCGTGGACGCCAAGGGCGGGTCTTTC	-	40
	>>>>	
	+1	
GGCCGGGAAGCCCCGTTGGTCCGGCGGGCTCTCCTTCCGATCCGCCAT	+	11
EagI	"	
+13		
CCGTGGTGAGTGTGCTGCGGGCTGCCGCTCCGGCTGGGGCTTCCCGC	+	61
""		
	+85	
GTCGCTCTCACCCCTGGTCGGCGGCTCTAACCGTCTCTTTCGAATGTAG	+	111
	"	
	:::	
GTGGAACCGCCGCCAAGATGCAGATTTCTGTGAAGACCCCTAACGGGAAA	+	161
M Q I F V K T L T G K		
ACGATCACGCTCGAGgtacgaaccagggtggcgtgagaaggcgcgc	+	211
T I T L E		
cagaggcccttatgctcgcttaaagctt	+	240
	HindIII	

1      2



*Abb. 6*

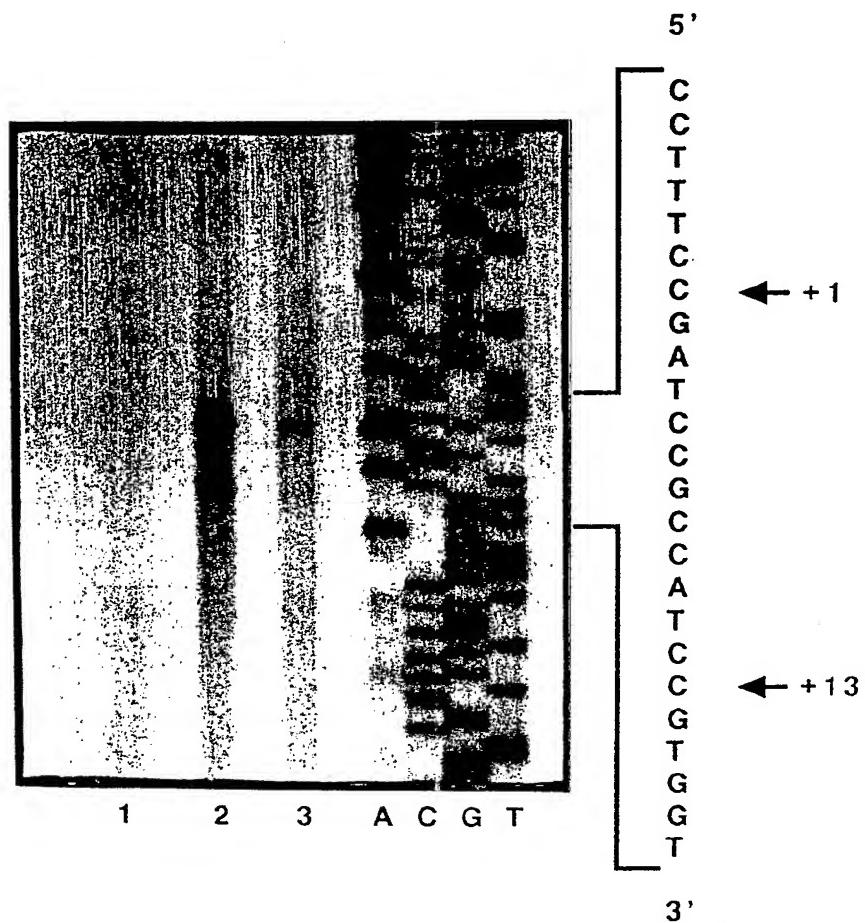


Abb. 7

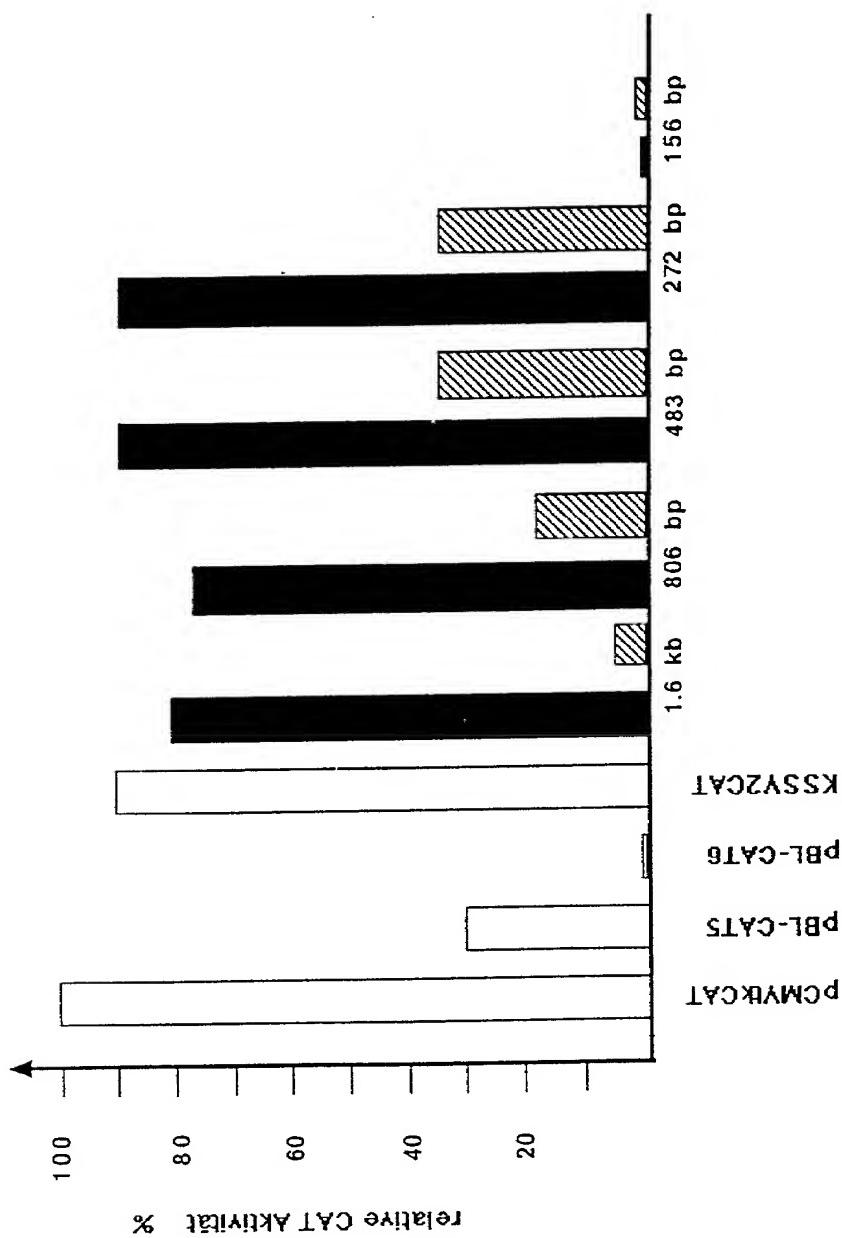


Abb. 8